

动 物 学 研 究 1998, 19 (4): 277~281 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

277-281

注射 Bestatin 对幼年大鼠分辨学习的影响

Q959.837

邹 伟[1] 张世仪
(辽宁师范大学生物系 大连 116029) (中国医学科学院基础医学研究所)

摘 要 以 Spraque-Dawley 大鼠为实验动物，从出生后第 1 天起，每日皮下分别注射氨基肽酶的抑制剂 Bestatin〔1 mg/kg (b.w)〕以及纳络酮〔2 mg/kg (b.w)〕+Bestatin〔1 mg/kg (b.w)〕，对照组注射等量的生理盐水，连续注射 14 天。观察：16 日龄幼鼠的吸乳迷津分辨学习(ADL)，30 日龄 Y 迷津明暗分辨学习(BDL)行为，45 日龄幼鼠皮层、海马、小脑、脑桥和间脑等不同部位蛋白质含量及微量元素锌含量的变化。结果表明，此剂量的 Bestatin 能明显抑制 ADL 和 BDL 行为，减少脑内尤其是海马内锌和蛋白质的含量。纳络酮有部分反转 Bestatin 的作用。提示在出生后脑发育过程中，内源性的阿片肽可能通过影响海马内蛋白质的合成而参与分辨学习行为发育的调制。

关键词 Bestatin，幼鼠，纳洛酮，分辨学习
中图分类号 Q959.837

近年来许多资料报道，阿片类物质不仅影响动物的学习记忆和行为，还能改变中枢神经系统的生长发育(Michael, 1991; Zagan 等, 1986)。我们以往的研究也表明，幼鼠出生后注射纳洛酮和脑啡肽可以影响其分辨学习行为和脑蛋白的含量(邹伟, 1994)。本文进一步观察出生后注射 Bestatin(一种氨基肽酶的抑制剂，能减慢体内脑啡肽的降解)对幼年大鼠吸乳迷津分辨学习(appetitive discrimination learning, ADL)、Y 迷津明暗分辨学习(brightness discrimination learning of Y-maze, BDL)、脑不同部位蛋白质含量及微量元素锌含量的影响，以探讨出生后脑发育期间内源性阿片肽与幼年动物学习行为发展的关系。

1 材料和方法

1.1 实验材料

以 Spraque-Dawley 大鼠的幼仔为实验动物($n=72$)，出生时平均体重(6.58±0.51) g，随机分成 3 组，各组雌雄各半。从出生后第 1 天开始，每日分别于幼鼠颈部皮下注射两次，每次间隔 10 min。Bestatin 组(S-B 组)：首先注射生理盐水，然后再注射 Bestatin 1 mg/kg (b.w)。纳络酮+Bestatin 组(N-B 组)：先注射纳洛酮 2 mg/kg (b.w)，再注射 Bestatin 1 mg/

[1]现在地址：大连医科大学生物化学教研室 116027
本文 1997-09-22 收到，1998-05-04 修回

kg (b.w)。对照组(S-S组)：先后两次注射等量的生理盐水，连续注射14天。分别在出生后16天和30天开始行为实验。实验用幼鼠在哺乳期与母鼠同窝饲养，自然光照，室温（18±3)℃。Bestatin和纳洛酮均为Sigma产品，实验前用生理盐水配制成所需的浓度。

1.2 行为实验

1.2.1 吸乳迷津分辨学习(ADL) 各组幼鼠均于出生后16日龄进行此项实验。具体方法已有报道(邹伟等，1994)。迷津内有3个臂：起始臂、左臂(L臂)、右臂(R臂)。L臂和R臂的顶端分别装有盛苦味酸(0.05%)和速溶奶粉冲剂的小塑料瓶。实验开始时，先让幼鼠在迷津中熟悉环境5 min，然后将其放入起始臂中，抽开挡板，记录时间。如幼鼠在1 min内进入L臂吸奶即为正确反应(CR)，奖励吸奶10 s；如幼鼠在1 min内进入R臂即为错误反应(ER)，惩罚吸苦味酸10 s；如幼鼠在1 min内原地不动或在两臂之间徘徊不定，则记为中性反应(MR)。每只幼鼠训练20次，每次间隔30 s。分别统计每只幼鼠的正确反应率(CR%)、错误反应率(ER%)，中性反应率(MR%)及正确反应的平均反应时(CRT)，作为衡量学习成绩的指标。

1.2.2 Y迷津明暗分辨学习(BDL) 各组幼鼠均在30日龄开始此项实验。实验在3等分辐射式迷宫中进行。迷宫中有3个臂，每个臂的顶端都装有1盏15 W的灯泡。箱底为平行相间的铜棒(间隔12 cm)。每只幼鼠适应环境5 min后放入起始臂中，此臂灯亮示安全区，其他两臂为黑暗。随机变换安全区的位置，使一臂灯亮。2 s后，如果幼鼠仍停留在黑暗处或跑向另一黑暗臂内，即会遭到足底电击(0.7 mA)，直到跑向安全区电击停止，完成1次学习任务。如幼鼠每次由起始臂中直接跑向安全区即为学习正确。间隔30 s，开始下次训练。每个实验日每只幼鼠训练20次以正确反应率达到90%作为学会的标准，以达到学会标准所需的训练次数(number of trial，NT)作为衡量学习成绩的指标，进行统计学处理。

1.3 脑蛋白含量的测定

待全部行为实验结束后，于45日龄时，将各组幼鼠快速断头处死，按Gliwinski方法取左前脑、右侧的皮层、海马、间脑、脑桥和小脑等部位分别称重，然后加入Tris-HCl缓冲液(pH7.2)研磨匀浆，离心后除去脂肪制成脑提取液。用紫外吸收法测定各组脑提取液中蛋白质的含量〔mg／g（脑组织)〕。仪器为日本产岛津-265型分光光度计(SHIMADZU)。

1.4 脑锌含量的测定

按上述方法取脑后，用去离子水洗涤2次，然后放入培养皿中，在105℃的烘箱中烘4 h取出，精确称重。分别加入硝酸和高氯酸(5∶1)的混合液5～10 mL，加热消化，冷却后加去离子水定容至5 mL。采用美国Leeman公司生产的高频电感耦合等离子体原子发射光谱(ICP-AES)(仪器型号：PLASMA-SPEC-1)测定皮层、海马、间脑、脑桥和小脑5个脑区锌的含量(邹伟等，1994)。

2 结 果

2.1 Bestatin对ADL和BDL学习行为的影响

出生后注射Bestatin，16日龄幼鼠的ADL的正确反应率(CR%)显著低于生理盐水对照组($P<0.01$)，中性反应率(MR%)增高，而注射纳洛酮后再注射Bestatin，其错误反应率(ER%)明显降低($P<0.01$)，正确反应率和对照组相比无明显的差别($P>0.05$)。30日龄开始BDL行为实验时，与对照组相比，幼鼠达标所需的训练次数(NT)显著增加($P<0.01$)，呈抑制效应。而在注射纳洛酮后再注射Bestatin时达标所需的训练次数与对

照组无明显差别(表 1)。

表 1　Bestatin 对幼鼠 ADL 和 BDL 行为的影响
Table 1　Effect of bestatin on ADL and BDL in infant rats

组别	ADL			BDL
	CR%	MR%	ER%	(NT)
S-S(n=12)	70.0±4.3	10.0±6.1	20.2±3.5	66.7±8 2
N-B(n=12)	76.3±9.3	12.5±7.2	11.3±3.1	80.8±6 5
S-B(n=12)	41.6±10.1**	34.2±8.4**	23.3±9.6	96.7±11.1**

$\bar{X}\pm SD$, ** $P<0\ 01$。

2.2　Bestatin 对幼鼠脑蛋白含量的影响

如表 2 所示，各组幼鼠 45 日龄时，不同脑区蛋白含量各不相同。在海马和小脑内，S-B 组的蛋白质含量均低于 S-S 组和 N-B 组($P<0.01$, $P<0.05$)，而其他各部分含量无明显差别。

表 2　Bestatin 对幼鼠脑蛋白含量的影响
Table 2　Effect of bestatin on the content of brain protine in infant rats
mg / g

	S-S (n=4)	S-B (n=4)	N-S (n=4)
皮层	60.46±6.3	58.73±3.1	62.72±2.9
海马	80.17±3.2	63.25±6.1**	85 13±4.8
间脑	68.07±2.4	67.07±1.7	70.14±7.6
脑桥	67.85±4.1	61.93±4.7	71.24±4.4
小脑	72.02±3.1	63.72±5.2*	71.58±3.7

$\bar{X}\pm SD$, ** $P<0.01$, * $P<0.05$。

表 3　Bestatin 对幼鼠脑内锌含量的影响
Table 3　Effect of bestain on the content of brain zinc in infant rats
μg / mg 干重

	S-S (n=4)	N-S (n=4)	S-B (n=4)
皮层	105.58±10.28	114.04±16.73	83.22±15.54
海马	143.02±18.86	157.97±25.82	106.75±16.38*
间脑	112.25±12.51	133.70±22.38	107.30±74.12
脑桥	110.25±9.9	122.43±28.04	102.50±11.16
小脑	107.37±16.28	133.65±28.06	102.25±33.68

$\bar{X}\pm SD$, * $P<0.05$。

2.3　Bestatin 对幼鼠脑内锌含量的影响

如表 3 所示，正常幼鼠(S-S 组)脑内不同部位锌含量不同。其中海马内锌含量最高。注射 Bestatin 后，各脑区锌的含量均减少，且海马内锌含量与对照组相比差异明显($P<0.01$)。N-B 组大鼠各部位的锌含量与 S-S 组和 S-B 组相比均增加。

3　讨　论

以前的工作表明，出生后连续注射阿片受体拮抗剂纳洛酮 2 mg / kg (b.w)促进幼鼠

16 日龄 ADL 及 30 日龄 BDL 行为，而注射脑啡肽 0.2 mg／kg（b.w)抑制幼鼠的两种分辨学习行为(邹伟等，1994)。本实验结果发现，出生后 1～14 天连续注射氨基肽酶的抑制剂 Bestatin 能明显抑制 ADL 和 BDL 两种分辨学习。如注射 Bestatin 以前，先注射有效剂量的纳洛酮，则具反转 Bestatin 的效应。此结果与张世仪等(1990，1992)脑内微量注射 Bestatin 影响大鼠操作式条件反射的结果相似。提示 Bestatin 可能通过抑制脑内氨基肽酶的降解使脑啡肽的水平升高，从而影响大鼠的分辨学习行为。另外，Bestatin 的抑制作用表现为幼鼠的中性反应率增加，而使正确反应率下降。其原因可能与分辨学习是一种运动性学习，脑啡肽对机体运动机能的作用也会影响分辨学习有关，但本实验的中性反应并非不反应，而是分辨不清，犹豫不定，故此抑制作用可能是直接的结果。

值得注意的是，幼鼠在脑发育期间的结构和机能尚未成熟，Bestatin 对学习行为发展的影响可能和成年大鼠不完全相同。Zagan 等(1986)曾指出，内源性阿片肽参与脑发育的调节，当出生后注射一种高剂量阿片受体拮抗剂——纳屈酮时，可促进大鼠脑和行为的发育。Vertes (1982)发现，纳洛酮可使脑内 DNA 含量增加。本实验发现幼鼠注射 Bestatin 后，海马和小脑内蛋白质含量明显降低，其他脑区无明显的变化。Peter 等(1993)报道，出生至断乳是大鼠脑发育的关键期，海马和小脑的大部分细胞是在此期间分化发育的，至断乳时其细胞数量可增加 3 倍左右，DNA 的含量在此时接近成年水平。说明出生后 1～14 日龄注射 Bestatin 可能通过脑内阿片肽系统，影响大鼠脑发育关键期海马等正在分化部位的蛋白质合成，从而影响幼鼠的学习记忆。

此外，由于微量元素锌与内源性阿片肽的水平及学习记忆密切相关(邹伟等，1994)，我们在实验中还观察了出生后注射 Bestatin 及纳洛酮对幼鼠脑内不同脑区锌含量的影响。结果发现 Bestatin 组幼鼠各脑区锌含量普遍低于对照组，尤以海马和小脑显著，而纳洛酮明显具有反转 Bestatin 的效应。资料表明(Essatara，1984；Christopher 等，1983)，脑内的锌主要分布于海马、下丘脑以及小脑的苔状神经节，它们与谷氨酸、去甲肾上腺素及脑啡肽类神经突触的功能有关。锌影响生物膜上的腺嘌呤环化酶、鸟嘌呤环化酶及 ATP 酶的活性，从而影响轴浆的运输、突触传递过程及学习记忆(Stengaard 等，1981)。此外，锌与蛋白质有特殊的亲和力，直接参与蛋白质的合成过程。在我们的实验中，锌和蛋白质测定的结果恰好吻合，说明体内阿片系统可能在大鼠出生后脑发育和学习记忆机能的发展中起重要的作用。

综上所述，出生后注射 Bestatin 能阻抑幼年大鼠分辨学习行为，内源性阿片肽系统影响脑发育中蛋白质的合成及学习行为。至于通过何种受体起作用，与其他递质有何关系，有待更深入地探讨。

参 考 文 献

邹 伟，张世仪，王建中等，1994. 新生期注射纳洛酮和脑啡肽对幼年大鼠分辨学习的影响. 动物学研究，15(4)：73～78.

邹 伟，赵永魁. 1994. 大鼠脑内微量元素的年龄特征研究. 神经解剖学杂志，10(3)：263～266.

张世仪，齐慧新，王 玢，1990 脑啡肽阻抑大鼠操作式条件反射的再现. 科学通报，35(10)：781～783.

张世仪，张艳萍，张敏磊等，1992. 尾壳核注射脑啡肽和bestatin对大鼠操作式条件反射的影响. 生理学报，44：448～451.

Christopher J, 1983. Cytoarchitectonic distribution of zinc in the hippocampus of man and rat. *Brain Res.*, **272**: 335-368

Essataea M B, Morley J E, Jevine A S *et al*, 1984. The rale of the endogennous opiates in zinc deficiency anoxia. *Physiol Behav*, **32**: 475-478

Michael W D, 1991. The role of interactions between the cholinergic system and neuromodulatory system in learning and memory. *Synapse*, 7: 151-168.

Peter J, Morgane P J, Robert A L, 1993. Prenatal malnutrition and developments of the brain. *Neurosci Biobehav Rev.*, **17**: 91-98.

Stengaard P, Fredens K, Larsson L I, 1981 Enkephalin and zinc in the hippocampal mossy fiber system. *Brain Res*, **21**: 230-233

Vertes Z, 1982 Effect of naloxone and D-Met-Pro-enkephalinamide treatment on the DNA synthesis in the developing rat brain *Life Sci*, **31**: 119-126

Zagan I S, Mclaughlin P J, 1986. Opiod antagnist-induced modulation of cerebral and hippocampl development: histological and morphometric studies. *Dev. Brain Res.*, **28**: 233-241.

EFFECT OF BESTATIN ON THE DISCRIMINATION LEARNING IN INFANT RATS

ZOU Wei

(*Department of Biology, Liaoning Normal University, Dalian* 116029)

ZHANG Shi-yi

(*Institute of Basic Medical Sciences, CAMS*)

Abstract

Infant Spraque-Dawley rat pups were divided into three groups and received daily injection of saline, bestatin [an aminopeptidase inhibitor, 1 mg / kg (b.w)] or naloxone [2 mg / kg (b.w)] +bestatin [1 mg / kg (b.w)] respectively from postnatal days 1-14. They were trained in the appetitive discrimination learning (ADL) at the age of 16 days, then in the bright discrimination learning of Y-maze (BDL) at 30 days of age. On postnatal days 45, the content of brain protein and zinc in cerebral cortex, hippocampus, cerebellum, pons, and diencephalon of the rats were examined. The results showed that the dose of bestatin inhibited significantly the learning behavior in ADL and BDL, and lowered the content of protein and zinc in hippocampus of the infant rats. Whereas, naloxone reversed partly the effect of bestatin. This suggested that the endogenous opiotide whould regulate some learning behavior through influncing synthesis of protein in hippocampus during postnatal brain development of infant rats.

Key words Bestatin, Infant rats, Naloxon, Discrimination